

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> A61K 39/395 // C12P 21/08, C12N 15/13, 15/06, C07K 16/28, 19/00	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> WO98/37913 <b>(43) 国際公開日</b> 1998年9月3日 (03.09.98)																						
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/00831 <b>(22) 国際出願日</b> 1998年2月27日 (27.02.98) <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/45663 1997年2月28日 (28.02.97) JP <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 小石原保夫(KOISHIHARA, Yasuo)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書																						
<b>(54) Title: LYMPHOCYTE ACTIVATION INHIBITORS</b> <b>(54) 発明の名称</b> リンパ球の活性化抑制剤 <b>(57) Abstract</b> Novel lymphocyte activation inhibitors which contain as the active ingredient antibodies binding specifically to a protein having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1. Anti-HM1.24 antibody is preferable as the above antibody. The inhibitors are usable as remedies and preventives for autoimmune diseases, rejection reactions in organ transplantation or allergy. <table border="1"><caption>Ht-IgG concentration (ng/ml)</caption><thead><tr><th>Condition</th><th>Ht-IgG concentration (ng/ml)</th></tr></thead><tbody><tr><td>a - SAC 刺激</td><td>~450</td></tr><tr><td>b - SAC 刺激 + 抗体無添加</td><td>~450</td></tr><tr><td>c - SAC 刺激 + 抗体無添加</td><td>~450</td></tr><tr><td>d - コントロール mlgG2a</td><td>~450</td></tr><tr><td>e - コントロール mlgG2a</td><td>~450</td></tr><tr><td>f - SAC + IL-6 刺激</td><td>~450</td></tr><tr><td>g - SAC + IL-6 刺激 + 抗体無添加</td><td>~450</td></tr><tr><td>h - コントロール mlgG2a</td><td>~450</td></tr><tr><td>i - コントロール mlgG2a</td><td>~450</td></tr><tr><td>j - 抗 HM1.24 抗体</td><td>~450</td></tr></tbody></table> <p>a ... stimulated with SAC b ... no stimulation with SAC c ... no antibody added d ... control mlgG2a e ... anti-HM1.24 antibody f ... stimulated with SAC + IL-6 g ... no antibody added h ... control mlgG2a i ... anti-HM1.24 antibody j ... Human IgG concentration (ng/ml) k ... (mean + SE)</p>			Condition	Ht-IgG concentration (ng/ml)	a - SAC 刺激	~450	b - SAC 刺激 + 抗体無添加	~450	c - SAC 刺激 + 抗体無添加	~450	d - コントロール mlgG2a	~450	e - コントロール mlgG2a	~450	f - SAC + IL-6 刺激	~450	g - SAC + IL-6 刺激 + 抗体無添加	~450	h - コントロール mlgG2a	~450	i - コントロール mlgG2a	~450	j - 抗 HM1.24 抗体	~450
Condition	Ht-IgG concentration (ng/ml)																							
a - SAC 刺激	~450																							
b - SAC 刺激 + 抗体無添加	~450																							
c - SAC 刺激 + 抗体無添加	~450																							
d - コントロール mlgG2a	~450																							
e - コントロール mlgG2a	~450																							
f - SAC + IL-6 刺激	~450																							
g - SAC + IL-6 刺激 + 抗体無添加	~450																							
h - コントロール mlgG2a	~450																							
i - コントロール mlgG2a	~450																							
j - 抗 HM1.24 抗体	~450																							

(57) 要約

新規なリンパ球活性化抑制剤の提供。

配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する、リンパ球活性化抑制剤。

上記抗体としては、抗 HM1.24 抗体が好ましく、本願発明のリンパ球活性化抑制剤は、自己免疫疾患、臓器移植時の拒絶反応、またはアレルギーの予防・治療剤として用いられる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	NZ	ニュージーランド
AM	アルメニア	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SD	スーダン
AT	オーストリア	GB	英国	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドバ	TM	トルクメニスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BB	バルバドス	GM	ギニア	MK	マケドニア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BE	ベルギー	GN	ギニア・ビサウ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MR	モロッコ	US	米国
BM	バハマ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UY	ウルグアイ
BN	ブラジル	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ベトナム
BO	ボリビア	IS	アイスランド	NE	ニジェール	ZW	ジンバブエ
BR	ブラジル	IT	イタリア	NL	オランダ		
BS	バハマ	JP	日本	NO	ノルウェー		
BT	ブータン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
BV	バレンツ	KG	キルギス	PL	ポーランド		
CA	カナダ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CC	ココス	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
CD	コンゴ	LC	セント・ルシア	RS	セルビア		
CE	セント・ヘレナ	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
CF	中央アフリカ	LK	スリランカ	SG	シンガポール		
CG	コンゴ	LR	リベリア	SI	スロベニア		
CH	スイス	LS	レソト				
CI	コートジボワール						
CK	クック						
CL	チリ						
CM	コンゴ						
CN	中国						
CO	コロンビア						
CR	コスタリカ						
CU	キューバ						
CY	キプロス						
CZ	チェコ						
DE	ドイツ						
EE	エストニア						
EG	エジプト						
ES	スペイン						

## 明 細 書

## リンパ球の活性化抑制剤

## 技術分野

本発明は、新規なリンパ球活性化抑制剤に関する。

## 背景技術

人間の生きている環境には、ウイルス、細菌、カビ、寄生虫等のおびただしい種類の感染性の微生物が存在している。そのいずれかが生体内で増殖すると病気の原因となり、ひいては個体の死をももたらす。従って、個体が健康的に生活するためには、これら外因性の微生物などから生体を防御する機構が必要となる。この機構が「免疫」と呼ばれるものである。

生体において主に免疫を担当するのがリンパ球細胞である。リンパ球細胞は、その機能によりTリンパ球（T細胞）とBリンパ球（B細胞）に大別される。T細胞は抗原提示能、細胞障害能等を、B細胞は抗体産生能を有していると考えられている。これら2種のリンパ球は全て同じ血液幹細胞に由来し、骨髓中あるいはその他の器官で様々な分化、または増殖因子の作用を受けて分化を繰り返した後、末梢血中へ放出される。

例えば、T細胞の場合、骨髓中で造血幹細胞が前T細胞に分化した後胸腺へと移行し、さらに分化を繰り返し成熟T細胞になる。その後抗原の刺激により活性化され、増殖能あるいは細胞障害能等を有する活性化T細胞となる。一方、B細胞の場合、骨髓中で造血幹細胞がIL-1, IL-2, IL-4, IL-6等のサイトカインの刺激によりプロB細胞、プレB細胞を経て成熟B細胞に分化し、さらに抗原刺激を受

けて活性化され、最終的に抗体産生能を有する形質細胞となる。

従って、リンパ球がそれぞれの機能を発揮するためには最終的な活性化が必須である。前述の通り、免疫は外来の異物から生体を防御することが目的であることから、巧みな機構により異物（非自己）と自己を認識し、非自己のみを抗原として反応する仕組みになっている。ところがこの機構が何らかの原因で破綻し、自己をも抗原と認識するようになった結果起こる疾患が自己免疫疾患である。また、非自己に対し免疫反応が過度に、あるいは不適当な形で起こり、その結果組織障害を引き起こす状態をアレルギーという。

一方、他人の臓器等を移植した場合、それを非自己と認識し排除しようとする反応（拒絶反応）は、生体の正常な機構ともいえる。個体間には遺伝学的に違いがあることが知られており、その代表的なものが主要組織適合遺伝子（MHC）と呼ばれるものである。MHCが異なる個体からの臓器移植は、大きな拒絶反応を引き起こす。近年の医療技術の進歩により、白血病、あるいはリンパ腫治療時の骨髄移植、末期腎疾患患者に対する腎移植、さらには角膜移植等、臓器等の移植の必要性は非常に大きなものとなっている。それに伴い、拒絶反応をいかに抑制するかも大きな問題といえる。

多くの実験や研究により、リンパ球の活性化からそれに起因する疾患に至る経路が解明されつつあり、それに伴い、リンパ球活性化関与疾患に対する多くの治療薬が開発されている。現在リンパ球活性化に起因する自己免疫疾患のうち、慢性関節リウマチや全身性エリトマトーデス、さらには強皮症に対してアスピリンのような非ステロイド性抗炎症薬やステロイド剤、アザチオプリンのような免疫抑制剤が使用されている。

また、臓器等移植時の拒絶反応を抑制する目的で、主に腎移植や骨髄移植の際にサイクロスポリンやアザチオプリン、ミゾリビン等

の免疫抑制剤が使用されている。さらに、アレルギーの治療薬としては抗ヒスタミン薬や、アレルギーの原因となる化学物質の遊離を抑制する化学伝達物質遊離抑制薬等が用いられている。しかし、これらのうち非ステロイド性抗炎症薬やステロイド剤、抗ヒスタミン薬や化学伝達物質遊離抑制薬はいずれも本疾患の原因であるリンパ球の活性化に対しては何ら作用せず、あくまで炎症を押さえる対症療法に過ぎないことから、本疾患を根本的に治療するものではない。

また、現在使用されている免疫抑制剤はその性質上、血球数減少やショック等の重篤な副作用を有するものも多く、未だ十分とは言い難い。さらに、自己免疫疾患の多くは現在も治療法や治療薬が全く無いのも現実である。

一方、Goto, T.らは、ヒト骨髓腫細胞をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体（抗HM1.24抗体）を報告している（Blood（1994）84, 1922-1930）。ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスに抗HM1.24抗体を投与すると、この抗体が腫瘍組織に特異的に集積したこと（小阪昌明ら、日本臨床（1995）53, 627-635）から、抗HM1.24抗体はラジオアイソトープ標識による腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピーなどのミサイル療法に応用することが可能であることが示唆されている。しかし、抗HM1.24抗体がリンパ球の活性化抑制に関与することは知られていなかった。

#### 発明の開示

現在用いられているリンパ球活性化関与疾患の治療薬には、種々の抗炎症剤や免疫抑制剤が挙げられるが、上記のごとく、未だ十分とは言い難く、これら疾患を治療し患者の苦痛を緩和する治療剤が待たれている。従って、本発明の目的は、リンパ球活性化抑制剤を

提供することである。

本発明者らは、所期の目的を達成すべく、抗HM1.24抗体（Goto, T.ら Blood (1994) 84, 1922-1930）を用いて、FCM（フローサイトメトリー）解析、T細胞の幼若化反応に対する作用、B細胞の抗体産生に対する作用、さらには抗HM1.24抗体が特異的に結合する抗原蛋白質単離の研究を重ねた結果、抗HM1.24抗体が認識する抗原タンパク質が活性化リンパ球に発現していること、および抗HM1.24抗体がリンパ球の活性化を抑制することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する、リンパ球の活性化抑制剤を提供する。

本発明はまた、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する、T細胞またはB細胞の活性化抑制剤を提供する。

本発明はまた、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を有効成分として含有する、リンパ球の活性化抑制剤を提供する。

本発明はまた、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する、ヒト抗体定常領域を有する抗体を有効成分として含有する、リンパ球の活性化抑制剤を提供する。

本発明はまた、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する、リンパ球の活性化抑制剤を提供する。

本発明はまた、キメラ抗体またはヒト型化抗体を有効成分として含有する、リンパ球の活性化抑制剤を提供する。

本発明はまた、キメラ抗HM1.24抗体またはヒト型化抗HM1.24抗体を有効成分として含有する、リンパ球の活性化抑制剤を提供する。

本発明はまた、抗HM1.24抗体が認識するエピトープと特異的に結合する抗体を有効成分として含有する、リンパ球の活性化抑制剤を提供する。

本発明はまた、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する、リンパ球活性化関与疾患の予防・治療剤を提供する。

さらに、本発明は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する、自己免疫疾患、臓器等移植時の拒絶反応、アレルギーの予防・治療剤を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗HM1.24抗体がSAC刺激によるB細胞からの抗体産生を抑制することを示す図である。

図2は、PHA刺激したT細胞を抗HM1.24抗体でFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図3は、活性化T細胞を抗HM1.24抗体でFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図4は、抗HM1.24抗体がPHA刺激によるT細胞の幼若化反応を抑制することを示す図である。

#### 発明の実施の形態

##### 1. 抗体の作製

###### 1-1. ハイブリドーマの作製

本発明で使用される抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、HM1.24抗原蛋白質やHM1.24抗原を発現する細胞を感作抗原として使用



して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原であるHM1.24抗原発現細胞としては、ヒト多発性骨髄腫細胞株であるKPM2（特開平7-236475）やKPC-32（Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400）を用いることができる。また、感作抗原として配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを使用することができる。

なお、感作抗原として使用される、配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするcDNAはpUC19ベクターのXbaI切断部位に間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19を含む大腸菌（*E. coli*）は、平成5年（1993年）10月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、Escherichia coli DH5 $\alpha$ （pRS38-pUC19）として、受託番号FERM BP-4434としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特開平7-196694参照）。このプラスミドpRS38-pUC19に含まれるcDNA断片を用いて遺伝子工学的手法により、抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを作製することができる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8: 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) 等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、センダイウィルス（HVJ）等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度のPEG 溶液を通常、30～60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をインビトロでHM1.24抗原またはHM1.24抗原

発現細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、HM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

具体的には、抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマの作製は、Goto, T.らの方法（Blood（1994）84、1922-1930）により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成7年9月14日にFERM BP-5233としてブタベスト条約に基づき国際寄託された抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウス（日本クレア製）の腹腔内に注入して腹水を得、この腹水から抗HM1.24抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5%BM-Condmed H1（Boehringer Mannheim 製）含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM 培地（GIBCO-BRL 製）、PFHM-II 培地（GIBCO-BRL 製）等で培養し、その培

養上清から抗HML24抗体を精製する方法で行うことができる。

#### 1-2. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。

具体的には、目的とする抗体を産生するハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. ら、Analytical Biochemistry, (1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia 製）等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia 製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002；Belyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸

菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

### 1-3. 改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト型化(Humanized)抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖V領域およびH鎖V領域をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々 Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-g $\kappa$ ) および Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究

所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5646およびFERM BP-5644としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特願平9-271536参照）。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号W0 96/02576 参照）。

具体的には、マウス抗体のCDR とヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号W0 96/02576 参照）。

CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

例えば、ヒト型化抗HM1.24抗体のL 鎖V 領域aバージョン（配列番号：2）およびH 鎖V 領域rバージョン（配列番号：3）をコードするDNA を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pUC19-RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$ ）および *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1）として、工業技術院生命工学工業技術研

究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5645およびFERM BP-5643としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特願平9-271536参照）。また、ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖V領域sバージョン（配列番号：4）をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1）として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成9年（1997年）9月29日にFERM BP-6127としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特願平9-271536参照）。キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用され、特に好ましいヒト抗体定常領域としてヒトC $\gamma$ を使用することができる。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域（framework region; FR）およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化抗HM1.24抗体が挙げられる（特願平9-271536参照）。ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖V領域の好ましい具体例としては、配列番号2に示される塩基配列でコードされるアミノ酸配列を有するものが挙げられる。また、ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖V領域の好ましい具体例としては、配列番号3又は4に示される塩基配列でコードされるアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

#### 1-4. 発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なブ



ロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリA シグナルを機能的に結合させたDNA あるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1  $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bact

eriol. (1987) 169, 4379 ) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、インビトロおよびインビボの産生系がある。インビトロの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えばニコティアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌

細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をインビトロで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、インビボにて抗体を産生してもよい。

一方、インビボの産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。

植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。

トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入

したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをAgrobacterium tumefaciens のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばNicotiana tabacum に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上述のように、インビトロまたはインビボの産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H 鎖) または軽鎖 (L 鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 W0 94-11523 参照)。

上述のように得られた抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合させ抗体修飾物として使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

## 2. 抗体の分離、精製

### 2-1. 抗体の分離、精製

前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては

、例えば、プロテインA カラム、プロテインG カラムが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、POROS、Sepharose F.F.等が挙げられる。

その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLCに適用することができる。また逆相HPLCを用いることができる。

## 2-2. 抗体の濃度測定

2-1 で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプルをPBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M 重炭酸緩衝液 (pH9.6) で1  $\mu$ g/ml に希釈したヤギ抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100  $\mu$ l を96穴プレート (Nunc製) に加え、4 °Cで一晩インキュベーションし、抗体を固層化する。

ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製) 100  $\mu$ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100  $\mu$ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。

洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

### 3. 細胞の調製

本発明で用いる細胞は、以下の方法で調製することができる。

#### 3-1. ヒト末梢血リンパ球画分の調製

健康人より採取した末梢血液をPBS(-)で1/2 希釈後、50 ml 遠心チューブ (BECTON DICKINSON製) 中でFicoll-paque (pharmacia 製) に重層し450 x g、室温で40分間遠心した後、境界層の単核球画分を分離する。同画分を10% 牛胎児血清 (Moregate製) 含有RPMI1640培地 (GIBCO-BRL 製) で適当密度に調製後、プラスチックシャーレ中で37°C、5 %CO<sub>2</sub>条件下にて1 時間インキュベートする操作を2 度行うことにより、シャーレに付着した細胞を除去する。残った非付着性の細胞をヒト末梢血リンパ球画分として以下の実験に用いることができる。

#### 3-2. SACによるヒト末梢血B 細胞の活性化

上記の通り調製したヒト末梢血リンパ球をポリプロピレンチューブ中、5 x 10<sup>6</sup> cells/mlの密度で1 ng/ml IL-6存在下、あるいは非存在下で0.01 % SAC (Pansorbin cells, Calbiochem. 製) と2 日間、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下でインキュベートすることで、末梢血リンパ球中のB 細胞を活性化することができる。

#### 3-3. ヒト末梢T 細胞の精製

ヒト末梢T 細胞は3-1 で調製したヒト末梢血リンパ球からCellec t Humm T cell Kit (Biotex製) を用いて、添付の方法に従い精製することができる。

#### 3-4. PHA 刺激によるヒト末梢血T 細胞の活性化

上記3-3 で精製したT 細胞を2%牛胎児血清 (Moregate製) 含有RP

MI1640培地に懸濁し24穴培養プレート中  $1 \times 10^6$  cell/1 ml/well の細胞密度で、1あるいは10  $\mu$ g/mlのPHA (Phytohemagglutinin, Sigma 製)を添加し37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下、4日間培養することで末梢血リンパ球中のT細胞を活性化することができる。

#### 4. FCM 解析

リンパ球細胞と本発明で使用される抗体との反応性は、FCM (フローサイトメトリー)解析で行うことができる。細胞としては、新鮮分離細胞あるいはそれをさらに培養した細胞を用いることができる。例えば新鮮分離細胞として、末梢血単核球、末梢血リンパ球、末梢血Tリンパ球、末梢血Bリンパ球などを用いることができる。

上記細胞をPBS(-)で洗浄した後、FACS 緩衝液 (2 %ウシ胎児血清、0.1 %アジ化ナトリウム含有PBS(-))で25  $\mu$ g/ml に希釈した抗HM1.24抗体あるいはコントロール抗体 100  $\mu$ l を加え、氷温下30分インキュベートする。FACS 緩衝液で洗浄した後、25  $\mu$ g/ml のFITC標識ヤギ抗マウス抗体 (GAM, Becton Dickinson 製) 100  $\mu$ l を加え、氷温下30分間インキュベートする。FACS 緩衝液で洗浄した後、600  $\mu$ l のFACS 緩衝液に懸濁し、FACScan (Becton Dickinson製)で各細胞の蛍光強度を測定すればよい。

#### 5. 効果の確認

リンパ球はその活性化に伴いT細胞では幼若化反応が、またB細胞では抗体産生が認められる。また、両細胞とも活性化に伴い、細胞表面の種々の抗原マーカーの出現あるいは消失が観察される。従って、本発明のリンパ球活性化抑制剤の効果を確認するには、本発明で使用される抗体をT細胞に添加し幼若化反応を抑制すること、また、本発明で使用される抗体をB細胞に添加し抗体産生を抑制すること、あるいは本発明で使用される抗体をリンパ球に添加し細胞表面の抗原マーカーの発現の変化を評価することにより行うことが

できる。

#### 5-1. T細胞の幼若化反応に対する抗HM1.24抗体の効果

前述の通り精製したヒト末梢T細胞を、2%牛胎児血清（Moregate製）含有RPMI1640培地に懸濁し96穴培養プレート中  $1 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l/wellの細胞密度で、1  $\mu$ g/mlのPHA（Phytohemagglutinin, Sigma製）及び抗HM1.24抗体またはコントロールマウスIgG2a 20  $\mu$ g/mlと共に37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下、4日間培養し、<sup>3</sup>H-チミジン（Amersham製）を1  $\mu$ Ci/well添加し、4時間後の取り込みを $\beta$ -counter（Pharmacia製）で測定すればよい。

#### 5-2. B細胞の抗体産生に対する抗HM1.24抗体の効果

前述の通り調製したヒト末梢血リンパ球をポリプロピレンチューブ中、 $5 \times 10^6$  cells/mlの密度で0.01% SAC（Pansorbin cells, Calbiochem.製）と2日間、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下でインキュベートすることで、末梢血リンパ球中のB細胞を活性化する。SAC処理した末梢血リンパ球を10%牛胎児血清（Moregate製）含有RPMI1640培地で懸濁し96穴培養プレート（BECTON DICKINSON製）で  $1 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l/wellの細胞密度で、抗HM1.24抗体またはコントロールマウスIgG2a 20  $\mu$ g/mlと共に37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下6日間培養した後、培養上清を回収する。

本培養上清中のIgG濃度は、ヒトIgG特異的ELISAで測定することができる。即ち、0.1M重炭酸緩衝液（pH9.6）で1  $\mu$ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG（TAGO製）100  $\mu$ lを96穴イムノプレート（Nunc製）に加え、4°Cで一晩インキュベーションし、抗体を固着化する。ブロッキングの後、適当に希釈した培養上清あるいは標品としてヒトIgG（CAPPEL製）100  $\mu$ lを添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

洗浄後、2000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIg



G (CAPPEL製) 100  $\mu$ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定すればよい。

#### 5-3. 細胞表面抗原マーカーの解析

前述の通り調製したヒト末梢血リンパ球、あるいはヒト末梢T細胞を、5-1 または5-2 の通りPHA またはSAC および抗HM1.24抗体またはコントロールマウスIgG2a とともに培養する。これら細胞を、活性化の前後で発現が変化する細胞表面抗原マーカー、たとえばCD10, CD25, CD38, CD40, CD47, CD54, CD98, PCA-1, HM1.24抗原等を認識する抗体と反応させる。これを前述4 の通りFCM 解析すればよい。

#### 5-4. 効果の確認と関連疾患

後述の実施例に示されるように、活性化リンパ球にHM1.24抗原が発現していること、また抗HM1.24抗体の添加によりTリンパ球の幼若化の抑制、さらにはBリンパ球の抗体産生抑制が認められた。これらのことから、抗HM1.24抗体はリンパ球の活性化を抑制する効果を有することが示された。

一方、リンパ球の活性化が関与する疾患としては、自己免疫疾患、臓器等の移植時の拒絶反応、アレルギーが挙げられる。具体的には自己免疫疾患として橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、アジソン (Addison) 病、早発性閉経、インスリン依存性糖尿病、グッドパスツール (Goodpasture) 症候群、重症筋無力症、男性不妊症、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、交感性眼炎、水晶体原性ぶどう膜炎、多発性硬化症、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、原発性胆汁性肝硬変症、活動性慢性肝炎、特発性肝硬変症、潰瘍性大腸炎、シェーグレ

ン症候群、慢性関節リウマチ、皮膚筋炎、強皮症、混合性結合組織病、円板状エリトマトーデス、全身性エリトマトーデス等が挙げられる（廣瀬俊一ら監訳、臨床免疫学イラストレイテッド(1994)南江堂）。

臓器等の移植時の拒絶反応として、腎、肝、心移植時の拒絶反応、角膜移植時の上皮性、あるいは内皮性拒絶反応、骨髓移植時のHVD、あるいはGVHD等が挙げられる（廣瀬俊一ら監訳、臨床免疫学イラストレイテッド(1994)南江堂）。アレルギーとして、アトピー疾患に代表されるI型アレルギー、薬物アレルギーに見られるII型アレルギー、各種の腎炎を引き起こすIII型アレルギー、化粧品や金属による皮膚炎などに代表されるIV型アレルギーが挙げられる（畔柳武雄ら、新免疫学叢書(7) 免疫とアレルギー(1981)医学書院）。従って、本発明の治療剤は、これらリンパ球活性化関与疾患の治療剤として有用である。

#### 6. 投与経路および製剤

本発明のリンパ球活性化抑制剤は、非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 Kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1 ~1000 mg、好ましくは5 ~50 mgの投与量を選ぶことができる。本発明のリンパ球活性化抑制剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロース

ナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

#### 実施例

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

##### 実施例1. 抗HM1.24抗体の作製

###### 1. 抗HM1.24抗体を含むマウス腹水の調製

抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマをGoto, T らの方法（Blood（1994）84. 1922-1930）に従い得た。

あらかじめ11、3 日前に2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン（和光純薬工業製）をそれぞれ500  $\mu$ l ずつ腹腔内に投与したBALB/c マウス（日本クレア製）に、本ハイブリドーマ $5 \times 10^6$  個を腹腔内に注入した。ハイブリドーマ注入後10日目より、マウスの腹腔内に溜った腹水を19ゲージの留置針ハッピーキャス（メディキット製）で採取した。採取した腹水は、低速遠心機RLX-131（トミー精工製）を用いて回転数1000、3000 rpmで2 回遠心し、ハイブリドーマ、血球等の雑排物を除去した。

###### 2. マウス腹水からの抗HM1.24抗体の精製

上記マウス腹水からの抗HM1.24抗体の精製は以下の方法で行った。マウス腹水に等量のPBS(-)を加えた後、中空糸フィルターメディアプレップ (MILLIPORE 製) を用いてろ過した後、高速抗体精製装置ConSep LC100 (MILLIPORE 製) およびHyper D Protein A カラム (カラム体積 20 ml、日本ガイシ製) を用い、付属の説明書に基づき吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4) を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は直ちに1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加してpH7.4 付近に調整した後、遠心限外濃縮器Centriprep 10 を用いて濃縮およびPBS(-)への緩衝液置換を行い、孔径0.22  $\mu$ m のメンブランフィルターMILLEX-GV (MILLIPORE 製) でろ過滅菌し、精製抗HM1.24抗体を得た。

### 3. コントロールマウスIgG2a の精製

コントロールマウスIgG2a の精製は以下の方法で行った。市販のマウスIgG2a(KAPPA)(UPC 10)腹水 (CAPPEL製) を精製水およびPBS(-)で溶解した。これを孔径0.2  $\mu$ m のメンブランフィルターAcrodisc (Gelman Sciences 製) を用いてろ過した後、高速抗体精製装置ConSep LC100 (MILLIPORE 製) およびHyper D Protein A カラム (カラム体積 20 ml、日本ガイシ製) を用い、付属の説明書に基づき吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4) を用いてアフィニティー精製した。

溶出画分は直ちに1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加してpH7.4 付近に調整した後、遠心限外濃縮器Centriprep 10 を用いて濃縮およびPBS(-)への緩衝液置換を行い、孔径0.22  $\mu$ m のメンブランフィルターMILLEX-GV (MILLIPORE 製) でろ過滅菌し精製コントロールマウスIgG2a を得た。

### 4. 抗体濃度の測定

精製抗体の濃度測定は吸光度の測定により行った。すなわち、精

製抗体をPBS(-)で希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/mlを1.35 OD として算出した。

## 実施例 2. SAC 刺激ヒト末梢血B 細胞の抗体産生に対する抗HM

### 1.24抗体の効果

#### 1. ヒト末梢血リンパ球画分の調製

健常人より採取した末梢血液をPBS(-)で1/2 希釈後、50 ml 遠心チューブ (BECTON DICKINSON製) 中でFicoll-paque (pharmacia 製) に重層し450 x g、室温で40分間遠心した後、境界層の単核球画分を分離した。同画分を10% 牛胎児血清 (Moregate製) 含有RPMI1640培地 (GIBCO 製) で適当密度に調製後、プラスチックシャーレ中で37°C、5 %CO<sub>2</sub>条件下にて1時間インキュベートする操作を2 度行うことにより、シャーレに付着した細胞を除去した。残った非付着性の細胞をヒト末梢血リンパ球画分として以下の実験に用いた。

#### 2. SACによるヒト末梢血B 細胞の活性化

上記の通り調製したヒト末梢血リンパ球をポリプロピレンチューブ中、 $5 \times 10^6$  cells/mlの密度で1 ng/ml IL-6存在下、あるいは非存在下で0.01 % SAC (Pansorbin cells, Calbiochem. 製) と2 日間、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下でインキュベートすることで、末梢血リンパ球中のB 細胞を活性化した。SAC 処理した末梢血リンパ球を10% 牛胎児血清 (Moregate製) 含有RPMI1640培地で懸濁し96穴培養プレート (BECTON DICKINSON製) で  $1 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l/wellの細胞密度で、抗HM1.24抗体またはコントロールマウスIgG2a 20  $\mu$ g/mlと共に37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下6 日間培養した後、培養上清を回収した。

#### 3. ヒトIgG の定量

上記培養上清中のIgG 濃度は、ヒトIgG 特異的ELISA で測定した。即ち、0.1M 重炭酸緩衝液 (pH9.6) で1  $\mu$ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAGO製) 100  $\mu$ l を96穴イムノプレート (Nunc製) に

加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固層化した。ブロッキングの後、適当に希釈した培養上清あるいは標品としてヒトIgG（CAPPEL製）100  $\mu$ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションした。

洗浄後、2000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG（CAPPEL製）100  $\mu$ l を加え、室温にて1時間インキュベートした。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550（Bio-Rad 製）を用いて405nmでの吸光度を測定した。

#### 4. 抗HM1.24抗体のSAC刺激ヒト末梢血B細胞の抗体産生に対する効果

図1に示すようにSAC刺激によりB細胞のIgG産生は増強され、ここにコントロールマウスIgG2a 20  $\mu$ g/mlを加えても変化はなかったが、抗HM1.24抗体20  $\mu$ g/mlを加えるとIgG産生の完全な抑制が観察された。従って、抗HM1.24抗体はB細胞の活性化を抑制することが示された。

#### 実施例3. PHA刺激ヒトT細胞幼若化反応に対するHM1.24抗体の効果

##### 1. ヒト末梢血T細胞の調製

ヒト末梢T細胞は実施例2で調製したヒト末梢血リンパ球からCelllect Humm T cell Kit（Biotex製）を用いて、添付の方法に従い精製した。

##### 2. FCM解析

精製T細胞を2%牛胎児血清（Moregate製）含有RPMI1640培地に懸濁し24穴培養プレート中  $1 \times 10^6$  cells/1 ml/wellの細胞密度で、0, 1, 10  $\mu$ g/mlのPHA（Phytohemagglutinin, Sigma 製）と共に37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下、4日間培養した。これらの一部は4日間の培養

後PHA を含まない2%牛胎児血清 (Moregate製) 含有RPMI1640培地に再懸濁し、さらに3日間培養した。これらの細胞をPBS(-)で洗浄した後、FACS緩衝液(2%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウム含有PBS(-))で25 $\mu$ g/mlに希釈した抗HM1.24抗体あるいはコントロール抗体100 $\mu$ lを加え、氷温下30分インキュベートした。

FACS緩衝液で洗浄した後、25 $\mu$ g/mlのFITC標識ヤギ抗マウス抗体(GAM, Becton Dickinson 製)100 $\mu$ lを加え、氷温下30分間インキュベートした。FACS緩衝液で洗浄した後、600 $\mu$ lのFACS緩衝液に懸濁し、FACScan (Becton Dickinson製)で各細胞の蛍光強度を測定した。その結果、図2に示す通り、PHAによるT細胞の活性化に伴って、細胞上にHM1.24抗原が発現されることが明らかとなった。さらに図3に示す通り、活性化されて一旦発現したHM1.24抗原は、その後の培養によって消失しないことが示された。

### 3. 抗HM1.24抗体のPHA刺激ヒトT細胞幼若化反応に対する効果

精製T細胞を2%牛胎児血清 (Moregate製) 含有RPMI1640培地に懸濁し96穴培養プレート中  $1 \times 10^5$  cells/200 $\mu$ l/wellの細胞密度で、1 $\mu$ g/mlのPHA (Phytohemagglutinin, Sigma 製) 及び抗HM1.24抗体またはコントロールマウスIgG2a 20 $\mu$ g/mlと共に37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下、4日間培養し、<sup>3</sup>H-チミジン (Amersham製) を1 $\mu$ Ci/well添加し、4時間後の取り込みを $\beta$ -カウンター (Pharmacia 製) で測定した。

その結果、図4に示すように、T細胞はPHA刺激による幼若化反応により<sup>3</sup>H-チミジン取り込みは上昇し、ここにコントロールマウスIgG2a 20 $\mu$ g/mlを加えても変化はなかったが、HM1.24抗体20 $\mu$ g/mlを加えると<sup>3</sup>H-チミジン取り込みの抑制が観察された。従って、抗HM1.24抗体はT細胞の活性化を抑制することが示された。

#### 参考例1. マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリド

### マの調製

Goto, T. et al., Blood (1994) 84, 1992-1930 に記載の方法にて、マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製した。

ヒト多発性骨髄腫患者骨髄由来の形質細胞株KPC-32 ( $1 \times 10^7$  個) (Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400) をBALB/Cマウス (チャールスリバー製) の腹腔内に6週間おきに2回注射した。

このマウスを屠殺する3日前にマウスの抗体産生価をさらに上昇させるために、 $1.5 \times 10^6$  個のKPC-32をマウスの脾臓内に注射した (Goto, T. et al., Tokushima J. Exp. Med. (1990) 37, 89)。マウスを屠殺した後に脾臓を摘出し、Groth, de St. & Schreideggerの方法 (Cancer Research (1981) 41, 3465) に従い摘出した脾臓細胞とミエローマ細胞SP2/0を細胞融合に付した。

KPC-32を用いたCell ELISA (Posner, M. R. et al., J. Immunol. Methods (1982) 48, 23) によりハイブリドーマ培養上清中の抗体のスクリーニングを行った。 $5 \times 10^4$  個のKPC-32を50 ml のPBSに懸濁し、96穴プレート (U底型、Corning、Iwaki製) に分注し37°Cで一晩風乾した。1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSでブロックした後、ハイブリドーマ培養上清を加え4にて2時間インキュベートした。次いで、4°Cにて1時間ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体 (Zymed製) を反応させ、洗浄後室温にて30分間o-フェニレンジアミン基質溶液 (Sumitomo Bakelite製) を反応させた。

2N硫酸で反応を停止させ、ELISA reader (Bio-Rad製) で492nmにおける吸光度を測定した。ヒト免疫グロブリンに対する抗体を産生するハイブリドーマを除去するために、陽性ハイブリドーマ培養



上清をヒト血清にあらかじめ吸着させ、他の細胞株に対する反応性をELISAにてスクリーニングした。陽性のハイブリドーマを選択し、種々の細胞に対する反応性をフローサイトメトリーで調べた。最後に選択されたハイブリドーマクローンを二度クローン化し、これをプリスタン処理したBALB/Cマウスの腹腔に注射して、腹水を取得した。

モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウムによる沈澱とプロテインA アフィニティクロマトグラフィーキット（Ampure PA、Amersham製）によりマウス腹水より精製した。精製抗体は、Quick Tag FITC結合キット（ベーリンガーマンハイム製）を使用することによりFITC標識した。

その結果、30のハイブリドーマクローンが産生するモノクローナル抗体がKPC-32およびRPMI 8226 と反応した。クローニングの後、これらのハイブリドーマの培養上清と他の細胞株あるいは末梢血単核球との反応性を調べた。

このうち、3つのクローンが形質細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体であった。これらの3つのクローンのうち、最もフローサイトメトリー分析に有用であり、かつRPMI 8226 に対するCDC活性を有するハイブリドーマクローンを選択し、HM1.24と名付けた。このハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のサブクラスを、サブクラス特異的抗マウスウサギ抗体（Zymed 製）を用いたELISAにて決定した。抗HM1.24抗体は、IgG2a  $\kappa$ のサブクラスを有していた。抗HM1.24抗体を産生するハイブリドーマHM1.24は、工業技術院生命工学工業研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成7年9月14日にFERM BP-5233としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

#### 参考例2. ヒト型化抗HM1.24抗体の作製

ヒト型化抗HM1.24抗体を下記の方法により得た。

参考例1 で作製されたハイブリドーマHM1.24から、常法により全RNA を調製した。これよりマウス抗体V 領域をコードするcDNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法および5'-RACE 法により、合成、増幅した。マウスV 領域をコードする遺伝子を含むDNA 断片を得、これらのDNA 断片を各々プラスミドpUC 系クローニングベクターに連結し、大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体から上記プラスミドを得、プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を常法に従い決定し、さらに各々のV 領域の相補性決定領域（CDR）を決定した。

キメラ抗HM1.24抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウス抗HM1.24抗体L 鎖およびH 鎖のV 領域をコードするcDNAをHEF ベクターに挿入した。また、ヒト型化抗HM1.24抗体を作製するために、CDR 移植法によりマウス抗HM1.24抗体のV 領域CDR をヒト抗体へ移植した。ヒト抗体のL 鎖としてヒト抗体REI のL 鎖を用い、ヒト抗体H 鎖としてフレームワーク領域（FR）1-3 についてはヒト抗体HG3 のFR1-3 を用いFR4 についてはヒト抗体JH6 のFR4 を用いた。CDR を移植した抗体が適切な抗原結合部位を形成するようにH 鎖V 領域のFRのアミノ酸を置換した。

このようにして作製したヒト型化抗HM1.24抗体のL 鎖およびH 鎖の遺伝子を哺乳類細胞で発現させるために、HEF ベクターに、各々の遺伝子を別々に導入し、ヒト型化抗HM1.24抗体のL 鎖またはH 鎖を発現するベクターを作製した。

これら二つの発現ベクターをCHO 細胞に同時に導入することにより、ヒト型化抗HM1.24抗体を産生する細胞株を樹立した。この細胞株を培養して得られたヒト型化抗HM1.24抗体のヒト羊膜由来細胞株WISHへの抗原結合活性および結合阻害活性を、Cell ELISAにて調べ

た。その結果、ヒト型化抗HM1.24抗体は、キメラ抗体と同等の抗原結合活性を有し、さらにビオチン化マウス抗HM1.24抗体を用いた結合阻害活性についても、キメラ抗体あるいはマウス抗体と同等の活性を有した。

なお、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖V領域およびH鎖V領域をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々 Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-g $\kappa$ ) および Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月29日に、各々 FERM BP-5646およびFERM BP-5644としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

また、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖V領域aバージョン(配列番号:2)およびH鎖V領域rバージョン(配列番号:3)をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々 Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-RVL<sub>a</sub>-AHM-g $\kappa$ ) および Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-RVH<sub>r</sub>-AHM-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月29日に、各々 FERM BP-5645およびFERM BP-5643としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

また、ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖V領域sバージョン(配列番号:4)をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-RVH<sub>s</sub>-AHM-g $\gamma$ 1)として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成9年(1997年)9月29日にFERM BP-6127としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

### 参考例3. HM1.24 抗原蛋白質cDNA のクローニング

抗HM1.24抗体が特異的に認識するHM1.24抗原蛋白質をコードする

cDNAをクローニングした。

# 1. cDNA ライブラリーの作製

## 1) 全RNA の調製

ヒト多発性骨髄腫細胞株KPM2 から、全RNA をChirgwinら (Biochemistry, 18, 5294 (1979)) の方法に従って調製した。すなわち、 $2.2 \times 10^8$  個のKPM2 を20 ml の4 M グアニジンチオシアネート (ナカライテスク製) 中で完全にホモジナイズさせた。ホモジネートを遠心管中の5.3 M 塩化セシウム溶液に重層し、次にこれをBeckman SW40ローター中で31,000rpm にて20℃で24時間遠心分離することによりRNA を沈殿させた。

RNA 沈殿物を70 %エタノールにより洗浄し、そして1 mM EDTA 及び0.5 % SDS を含有する10 mM Tris-HCl (pH7.4 ) 300  $\mu$ l 中に溶解し、それにPronase (Boehringer製) を0.5 mg/ml となるように添加した後、37℃にて30分間インキュベートした。混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、RNA をエタノールで沈殿させた。次に、RNA 沈殿物を1mM EDTAを含有する10 mM Tris-HCl (pH7.4 ) 200  $\mu$ l に溶解した。

## 2) poly(A) + RNA の調製

前記のようにして調製した全RNA の約500  $\mu$ g を材料としてFast Track 2.0 mRNA Isolation Kit (Invitrogen製) を用いてキット添付の処方に従って poly(A)+RNA を精製した。

## 3) cDNAライブラリーの構築

上記 poly(A)+RNA 10  $\mu$ g を材料としてcDNA合成キットTimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia 製) を用いてキット添付の処方に従って二本鎖 cDNA を合成し、更にDirectional Cloning Toolbox (Pharmacia 製) を用いてキット付属の EcoRIアダプターをキット添付の処方に従って連結した。EcoRI アダプターのカイネーショ

ン及び制限酵素 NotI 処理はキット添付の処方に従って行った。更に、約 500 bp 以上の大きさのアダプター付加二本鎖 cDNA を 1.5 % 低融点アガロースゲル (Sigma 製) を用いて分離、精製し、アダプター付加二本鎖 cDNA 約 40  $\mu$ l を得た。

このようにして作製したアダプター付加二本鎖 cDNA を、あらかじめ制限酵素 EcoRI、NotI 及びアルカリフォスファターゼ (宝酒造製) 処理した pCOS1ベクター (特願平8-255196) と T4 DNA リガーゼ (GIBCO-BRL 製) を用いて連結し、cDNAライブラリーを構築した。構築した cDNA ライブラリーは、大腸菌細胞株 DH5 $\alpha$  (GIBCO-BRL 製) に形質導入され、全体のサイズは約  $2.5 \times 10^8$  個の独立したクローンであると推定された。

## 2. 直接発現法によるクローニング

### 1) COS-7 細胞へのトランスフェクション

上記の形質導入した大腸菌約  $5 \times 10^5$  クローンを 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む 2-YT 培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) にて培養することにより cDNA の増幅を行い、アルカリ法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) により大腸菌からプラスミド DNA を回収した。得られたプラスミド DNA は Gene Pulser 装置 (Bio-Rad 製) を用いてエレクトロポレーション法により COS-7細胞にトランスフェクションした。

すなわち、精製したプラスミド DNA 10  $\mu$ g を  $1 \times 10^7$  細胞/ml で PBS中に懸濁した COS-7細胞液 0.8 ml に加え、1500 V、25  $\mu$ FD の容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞は、10 %牛胎児血清 (GIBCO-BRL 製) を含む DMEM培養液 (GIBCO-BRL 製) にて、37°C、5 %CO<sub>2</sub>の条

件下で3日間培養した。

## 2) パンニングディッシュの調製

マウス抗HM1.24抗体をコーティングしたパンニングディッシュを、B. Seed ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3365-3369 (1987)) の方法に従って調製した。すなわち、マウス抗HM1.24抗体を10  $\mu$ g/mlになるように 50 mM Tris-HCl (pH9.5) に加えた。このようにして調製した抗体溶液3 mlを直径60 mm の細胞培養皿に加え、室温にて2 時間インキュベートした。0.15 M NaCl 溶液にて3 回洗浄した後、5%牛胎児血清、1 mM EDTA 、0.02 %NaN<sub>3</sub>を含むPBS を加え、ブロッキングした後、下記クローニングに用いた。

## 3) cDNA ライブラリーのクローニング

前述のようにトランスフェクトした COS-7 細胞は、5 mM EDTA を含むPBS にて剥がし、5%牛胎児血清を含むPBS で一回洗浄した後、約  $1 \times 10^6$ 細胞/mlとなるように5%牛胎児血清及び0.02% NaN<sub>3</sub>を含むPBS に懸濁し、上記のように調製したパンニングディッシュに加え、室温にて約 2 時間インキュベートした。5 % 牛胎児血清及び0.02 %NaN<sub>3</sub>を含むPBS で3度緩やかに洗浄した後、0.6%SDS 及び10 mM EDTAを含む溶液を用いてパンニングディッシュに結合した細胞からプラスミド DNAの回収を行った。

回収したプラスミド DNAを再び大腸菌DH5  $\alpha$ に形質導入し、前述のようにプラスミドDNA を増幅後、アルカリ法にて回収した。回収したプラスミド DNAを COS-7細胞にエレクトロポレーション法によりトランスフェクトして前述と同様に結合した細胞よりプラスミド DNA の回収を行った。同様の操作を更に1回繰り返し、回収したプラスミドDNA を制限酵素EcoRI およびNotIで消化した結果、約 0.9 kbpのサイズのインサートの濃縮が確認された。

さらに、回収したプラスミドDNA の一部を形質導入した大腸菌を

50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む2-YTアガープレートに接種し、一晚培養後、単一のコロニーよりプラスミドDNAを回収した。制限酵素EcoRI およびNotIにて消化し、インサートのサイズが約 0.9 kbpを示すクローンp3.19を得た。

本クローンについては、PRISM, Dye Terminator Cycle Sequencingキット（PerkinElmer 製）を用いて、キット添付の処方に従い反応を行い、ABI 373A DNA Sequencer（Perkin Elmer製）にて塩基配列の決定を行った。この塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号1に示す。

#### 産業上の利用可能性

抗HM1.24抗体の処理によりB細胞からの抗体産生抑制、およびT細胞の幼若化の抑制が認められた。これらのことから、抗HM1.24抗体はリンパ球の活性化を抑制する効果を有することが示される。

特許協力条約第13規則の2の寄託された微生物への言及及び寄託機関

寄託機関 名称：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

微生物（1）名称：Escherichia coli DH5 $\alpha$ （pRS38-pUC19）

寄託番号：FERM BP-4434

寄託日：1993年10月5日

（2）名称：ハイブリドーマHM1.24

寄託番号：FERM BP-5233

寄託日：1995年9月14日

（3）名称：Escherichia coli DH5 $\alpha$ （pUC19-RVHr-AHM-g  
 $\gamma$ 1）

寄託番号：FERM BP-5643

寄託日：1996年 8 月 29日

( 4 ) 名称：Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-1.24H-g  $\gamma$  l)

寄託番号：FERM BP-5644

寄託日：1996年 8 月 29日

( 5 ) 名称：Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-RVL $\alpha$ -AHN-g  
 $\kappa$  )

寄託番号：FERM BP-5645

寄託日：1996年 8 月 29日

( 6 ) 名称：Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-1.24L-g  $\kappa$   
)

寄託番号：FERM BP-5646

寄託日：1996年 8 月 29日

( 7 ) 名称：Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-g  
 $\gamma$  l)

寄託番号：FERM BP-6127

寄託日：1997年 9 月 29日



## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1013

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA

## 配列

GAATTCGGCA CGAGGGATCT GG ATG GCA TCT ACT TCG TAT GAC TAT TGC AGA	49
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg	
5 10	
GTG CCC ATG GAA GAC GGG GAT AAG CGC TGT AAG CTT CTG CTG GGG ATA	97
Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile	
15 20 25	
GGA ATT CTG GTG CTC CTG ATC ATC GTG ATT CTG GGG GTG CCC TTG ATT	145
Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile	
30 35 40	
ATC TTC ACC ATC AAG GCC AAC AGC GAG GCC TGC CGG GAC GGC CTT CGG	193
Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg	
45 50 55	
GCA GTG ATG GAG TGT CGC AAT GTC ACC CAT CTC CTG CAA CAA GAG CTG	241
Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu	
60 65 70	
ACC GAG GCC CAG AAG GGC TTT CAG GAT GTG GAG GCC CAG GCC GCC ACC	289
Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr	
75 80 85 90	

TGC AAC CAC ACT GTG ATG GCC CTA ATG GCT TCC CTG GAT GCA GAG AAG 337  
 Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys  
                     95                    100                    105  
 GCC CAA GGA CAA AAG AAA GTG GAG GAG CTT GAG GGA GAG ATC ACT ACA 385  
 Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr  
                     110                    115                    120  
 TTA AAC CAT AAG CTT CAG GAC GCG TCT GCA GAG GTG GAG CGA CTG AGA 433  
 Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg  
                     125                    130                    135  
 AGA GAA AAC CAG GTC TTA AGC GTG AGA ATC GCG GAC AAG AAG TAC TAC 481  
 Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr  
                     140                    145                    150  
 CCC AGC TCC CAG GAC TCC AGC TCC GCT GCG GCG CCC CAG CTG CTG ATT 529  
 Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile  
 155                    160                    165                    170  
 GTG CTG CTG GGC CTC AGC GCT CTG CTG CAG TGA GATCCCAGGA AGCTGGCACA 582  
 Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln \*\*\*  
                     175                    180                    185  
 TCTTGAAGG TCCGTCCTGC TCGGCTTTTC GCTTGAACAT TCCCTTGATC TCATCAGTTC 642  
 TGAGCGGCTC ATGGGGCAAC ACGGTTAGCG GGGAGAGCAC GGGGTAGCCG GAGAAGGGCC 702  
 TCTGGAGCAG GTCTGGAGGG GCCATGGGGC AGTCCTGGGT GTGGGGACAC AGTCGGGTTC 762  
 ACCCAGGGCT GTCTCCCTCC AGAGCCTCCC TCCGACAAT GAGTCCCCC TCTTGTCTCC 822  
 CACCCTGAGA TTGGGCATGG GGTGCGGTGT GGGGGGCATG TGCTGCCTGT TGTTATGGGT 882  
 TTTTTTTGCG GGGGGGGTTG CTTTTTTCTG GGGTCTTTGA GCTCCAAAAA AATAAACT 942  
 TCCTTTGAGG GAGAGCACCA CACCTTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAATTC 1002  
 GGGCGGCCGC C 1013

配列番号 : 2

配列の長さ : 3 7 9

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
-15 -10 -5	
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC	96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala	
-1 1 5 10	
AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCT AGT CAG GAT GTG	144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val	
15 20 25	
AAT ACT GCT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG	192
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	
30 35 40 45	
CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGT GTG CCA AGC AGA	240
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg	
50 55 60	
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser	
65 70 75	
CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAG CAA CAT TAT AGT	336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser	
80 85 90	

ACT CCA TTC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C 379  
 Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 95 100 105

配列番号 : 3

配列の長さ : 4 1 8

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
 -15 -10 -5  
 GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10  
 CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25  
 ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT 240  
 Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser  
 50 55 60  
 CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC 288  
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
 65 70 75

ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
           80                    85                    90  
 TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
           95                    100                    105  
 TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
           110                    115                    120

配列番号 : 4

配列の長さ : 4 1 8

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
                     -15                    -10                    -5  
 GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
           -1   1                    5                    10  
 CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
           15                    20                    25  
 ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
           30                    35                    40                    45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATC ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する、リンパ球の活性化抑制剤。
2. リンパ球が T 細胞である、請求項 1 に記載の抑制剤。
3. リンパ球が B 細胞である、請求項 1 に記載の抑制剤。
4. 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抑制剤。
5. 抗体がヒト抗体定常領域を有する、請求項 4 に記載の抑制剤。
6. 抗体がキメラ抗体またはヒト型化抗体である、請求項 4 又は 5 に記載の抑制剤。
7. 抗体が抗 HM1.24 抗体である、請求項 4 に記載の抑制剤。
8. 抗体がキメラ抗 HM1.24 抗体である、請求項 6 に記載の抑制剤。
9. 抗体がヒト型化抗 HM1.24 抗体である、請求項 6 に記載の抑制剤。
10. 抗体が抗 HM1.24 抗体が認識するエピトープと特異的に結合する、請求項 1 に記載の抑制剤。
11. 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する、リンパ球活性化関与疾患の予防・治療剤。
12. リンパ球活性化関与疾患が自己免疫疾患、臓器等移植時の拒絶反応、またはアレルギーである、請求項 11 に記載の予防・治療剤。

Fig.1

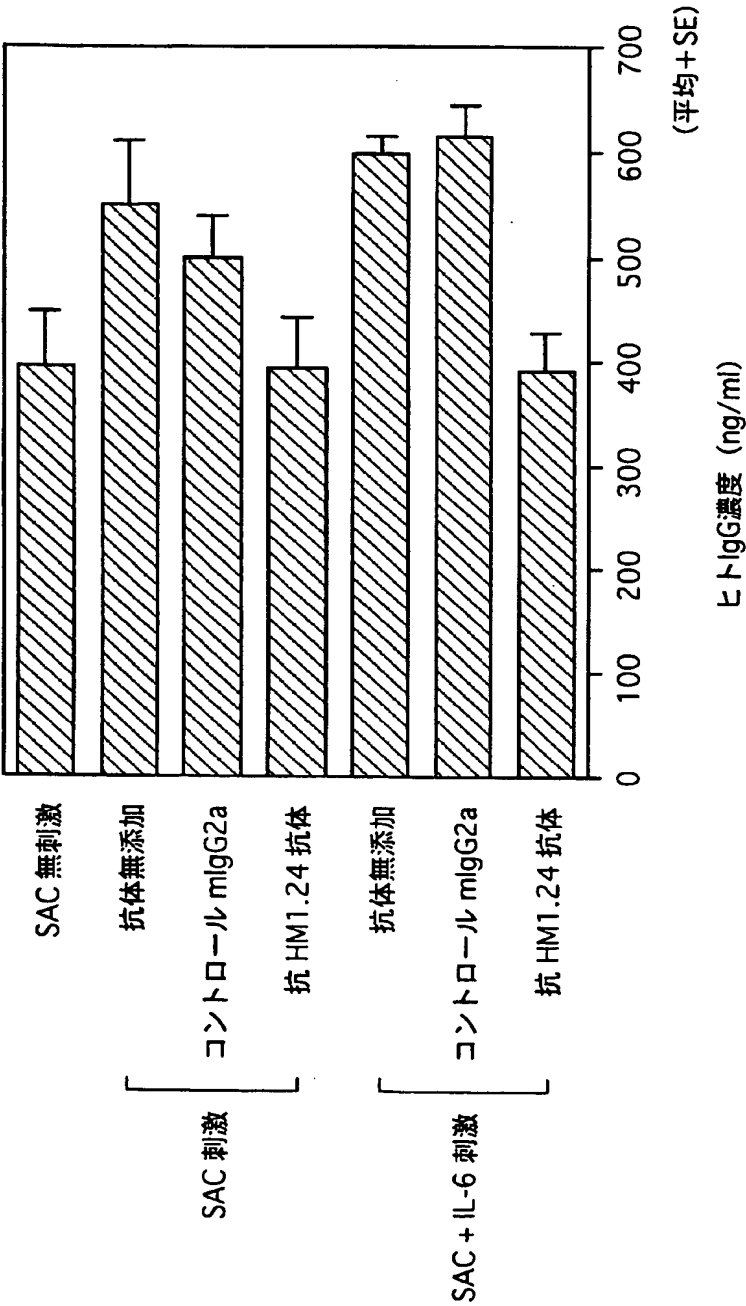




Fig.2

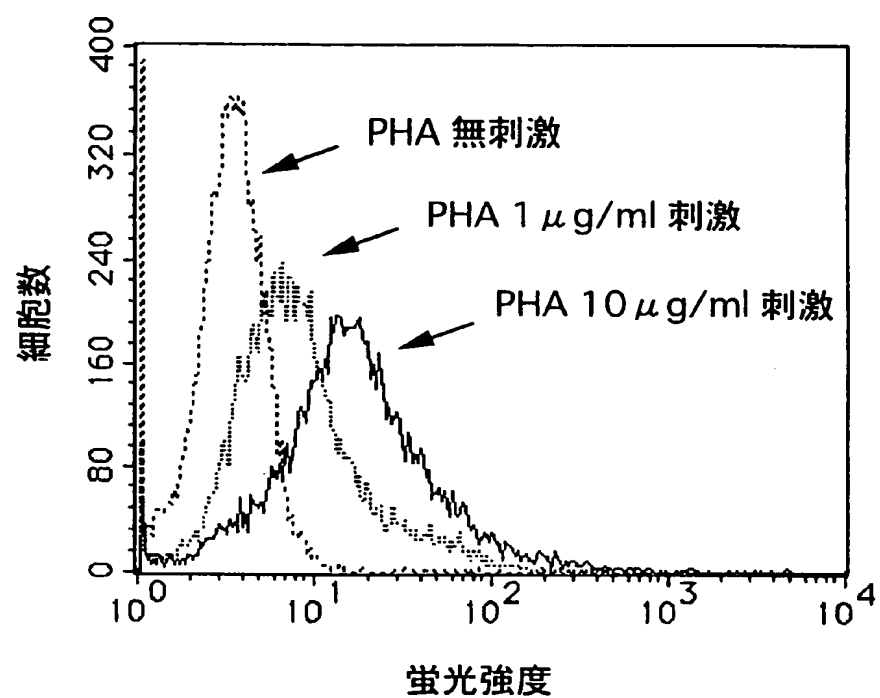


Fig. 3

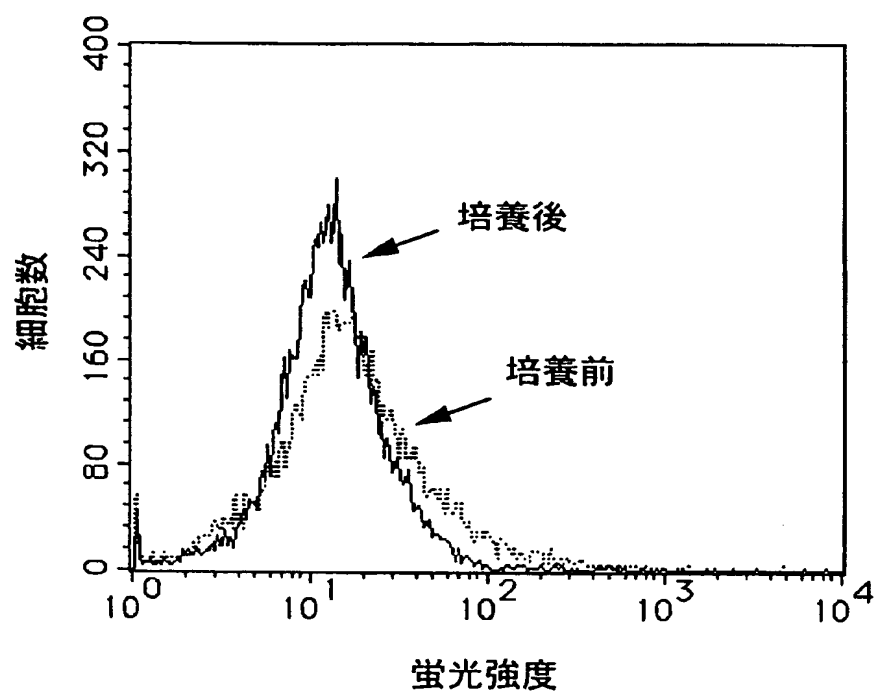
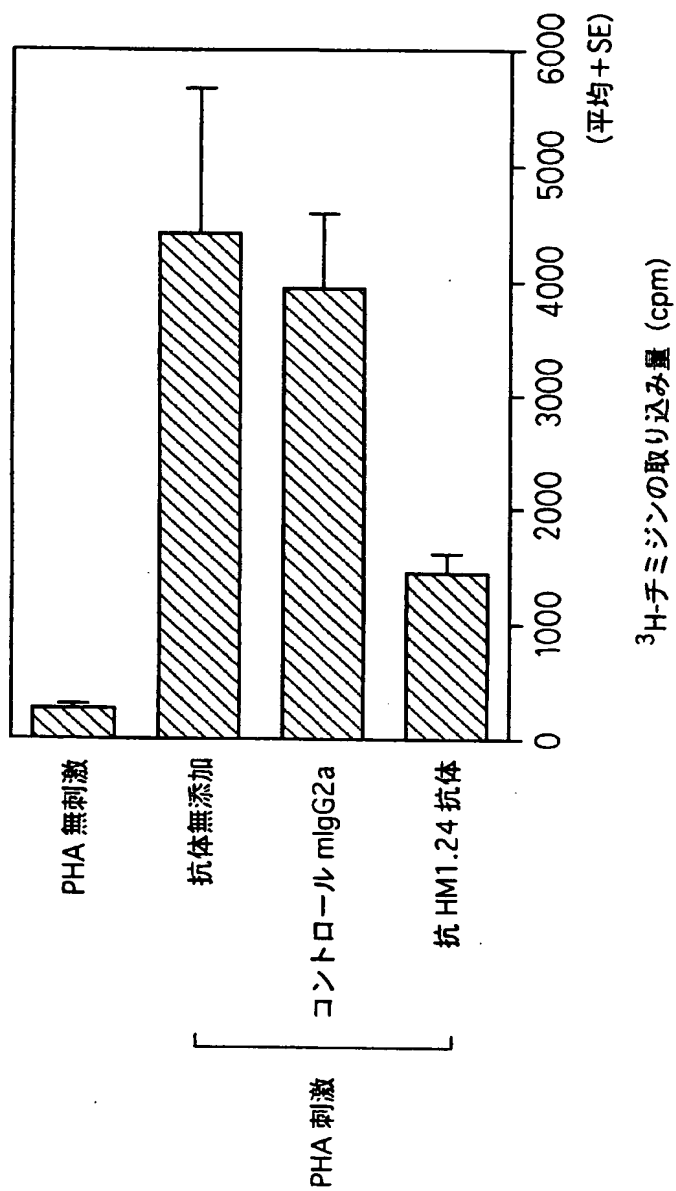


Fig. 4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00831

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> A61K39/395 // C12P21/08, C12N15/13, C12N15/06, C07K16/28, C07K19/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> A61K39/395 // C12P21/08, C12N15/13, C12N15/06, C07K16/28, C07K19/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOTECHABS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOTO, Tetsuya et al., "A Novel Membrane Antigen Selectively Expressed on Terminally Differentiated Human B Cells" Blood, 1994, Vol. 84, No. 6, pages 1922 to 1930	1-12
A	OZAKI, Keiji et al., "Localization and imaging of human plasmacytoma xenografts in severe combined immunodeficiency mice by a new murine monoclonal antibody, anti-HM1.24" Tokushima J. exp. Med., July 1996, Vol. 43, No.1-2, pages 7 to 15	1-12
P, A	OZAKI, Shuji et al., "Immunotherapy of Multiple Myeloma With a Monoclonal Antibody Directed Against a Plasma Cell-Specific Antigen, HM1.24" Blood, October 1997, Vol. 90, No. 8, pages 3179 to 3186	1-12
E, A	WO, 98/14580, A1 (Chugai Seiyaku K.K.), April 9, 1998 (09. 04. 98) (Family: none)	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search May 12, 1998 (12. 05. 98)		Date of mailing of the international search report May 19, 1998 (19. 05. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/00831

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A61K39/395 // C12P21/08, C12N15/13, C12N15/06, C07K16/28, C07K19/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A61K39/395 // C12P21/08, C12N15/13, C12N15/06, C07K16/28, C07K19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOTECHABS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GOTO, Tetsuya et al., 'A Novel Membrane Antigen Selectively Expressed on Terminally Differentiated Human B Cells' Blood, 1994, Vol. 84, No. 6, pages 1922 to 1930	1-12
A	OZAKI, Keiji et al., 'Localization and imaging of human plasmacytoma xenografts in severe combined immunodeficiency mice by a new murine monoclonal antibody, anti-HM1.24' Tokushima J. exp. Med., July 1996, Vol. 43, No. 1-2, pages 7 to 15	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.05.98

国際調査報告の発送日

19.05.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	OZAKI, Shuji et al., 'Immunotheraopy of Multiple Myeloma With a Monoclonal Antibody Directed Against a Plasma Cell-Specific Antigen, HM1.24' Blood, October 1997, Vol. 90, No. 8, pages 3179 to 3186	1-12
E, A	WO, 98/14580, A1 (Chugai Seiyaku K. K.) 9. 4月. 1998 (09. 04. 98) (ファミリーなし)	1-12